

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 21, 1983, pp. 347–355

Vorläufig ausgewählte Methode für die enzymatische Bestimmung des Gesamt-Cholesterins im Serum¹⁾

Bearbeiter: Prof. Dr. R. Kattermann, Mannheim
Frau Prof. Dr. Ingeborg Ruth Kupke, Düsseldorf
Prof. Dr. K. Borner, Berlin

Mitarbeiter: Prof. Dr. G. Assmann, Münster
Prof. Dr. M. Eggstein, Tübingen
Dr. P. Gambert, Dijon
Priv. Doz. Dr. Dr. C. C. Heuck, Heidelberg
Prof. Dr. F. H. Kreutz, Kassel
Prof. Dr. D. Seidel, Göttingen
Prof. Dr. L. Siekmann, Bonn
Prof. Dr. Dr. D. Stamm, München
Priv. Doz. Dr. H. Wieland, Göttingen

(Eingegangen am 3. Juli/26. November 1982)

Zusammenfassung: Es wird eine Methode für die enzymatische Bestimmung des Gesamt-Cholesterins im Serum beschrieben: Herstellung der Lösungen aus käuflichen Reagentien und Enzymen, manuelle Testdurchführung, Photometrie des gebildeten, stabilen Farbstoffs im Bereich von $\lambda = 500-550$ nm und Berechnung über einen mitgeführten Cholesterinstandard oder mit einem konstanten Faktor. Es werden die Gütekriterien der Methode mitgeteilt: Die Unpräzision anhand eines Ringversuchs in 3 Laboratorien, die Richtigkeit anhand eines Methodenvergleichs mit einer „Definitiven Methode“ bzw. einer „Referenzmethode“. Auf Störfaktoren und Einflußgrößen bei der enzymatischen Cholesterin-Bestimmung sowie auf einschlägige Untersuchungen zum Problem der Referenzbereiche wird abschließend eingegangen.

Candidate Selected Method for the enzymatic determination of total cholesterol in serum

Summary: An enzymatic method is described for the determination of total cholesterol in serum using a single aqueous reagent which can easily be prepared from commercial substrates and enzymes. The determination is carried out manually, the resulting stable chromogen is measured at a wavelength of 500–550 nm. The cholesterol concentration may be calculated either using a primary cholesterol standard or a constant factor for a given wavelength. The reliability of the method is reported: Data for the imprecision are given on the basis of a survey in 3 laboratories, the accuracy is established by comparison with a definitive and a reference method. Analytical and biological interferences are briefly discussed and results with this enzymatic method are reported concerning the reference values for serum cholesterol.

Einführung

Die Bestimmung von Cholesterin im Serum besitzt erhebliche praktische Bedeutung für die Erkennung

und Therapiekontrolle primärer und sekundärer Hyperlipidämien. Die in zahllosen Modifikationen beschriebenen chemischen Bestimmungsmethoden werden seit einigen Jahren zunehmend zugunsten der enzymatischen Verfahren verlassen. Diese beruhen auf einer Spaltung der im Serum vorkommenden Cholesterin-Fettsäureester durch bakterielle Cholesterinesterase mit nachfolgender Oxidation

¹⁾ Ausgearbeitet, beraten und geprüft von der Arbeitsgruppe Lipide und Lipoproteine in der Standardisierungskommission der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie e.V. auf der Grundlage eines Editorials der Standardisierungskommission: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 277–282 (1979).

des gesamten Cholesterins durch bakterielle Cholesterinoxidase (s. Abschnitt 4.1). Die enzymatische Cholesterinbestimmung zeichnet sich durch hohe Spezifität und geringe Störanfälligkeit aus. Da weder ein Extraktionsschritt noch aggressive Reagentien verwendet werden, kann die Methode ohne Schwierigkeiten an mechanisierte Analysensysteme adaptiert werden. Angesichts dieser vielfältigen Anwendungsmöglichkeit und der weltweit bestätigten, guten Zuverlässigkeit wird die im folgenden beschriebene enzymatische Cholesterinbestimmung als „Ausgewählte Methode“ vorgeschlagen.

2. Prinzip

2.1 Reaktionsablauf

Die enzymatische Cholesterin-Bestimmung geht auf Untersuchungen von *Richmond* (1), *Flegg* (2) und *Allain et al.* (3) zurück und besteht aus folgenden Teilschritten (s. Abb. 1):

- 2.1.1 Probenverdünnung und Emulgierung der Lipoproteine durch geeignete Detergentien
- 2.1.2 Esterspaltung durch bakterielle Cholesterin-esterase
- 2.1.3 Oxidation des Cholesterins durch Cholesterinoxidase unter Bildung von Δ^4 -Cholestenon und Wasserstoffperoxid
- 2.1.4 Oxidative Kupplung von Phenol und 4-Aminophenazon durch Wasserstoffperoxid und eine Peroxidase zu einem roten Farbstoff.

Die Absorption dieses Farbstoffs ist der Cholesterinkonzentration im Ansatz proportional und kann im Bereich von 500–550 nm photometrisch gemessen werden, wie das Spektrum des Farbstoffs zeigt (s. Abb. 2).

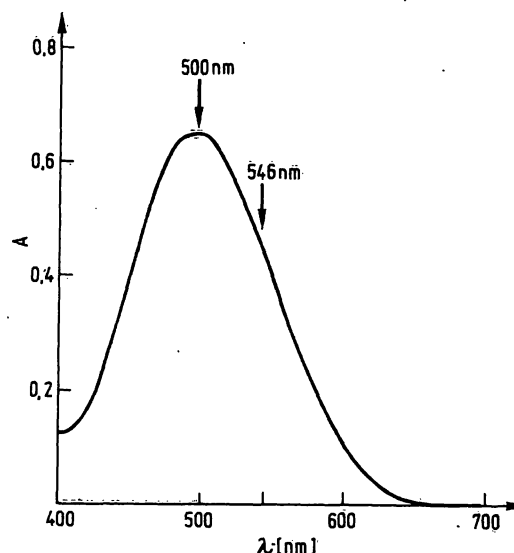


Abb. 2. Spektrum des in der Indikator-Reaktion gebildeten Farbstoffs: 4-(*p*-Benzochinon)-monoimino-phenazon. Verwendung eines primären Cholesterin-Standards in Isopropanol (5,17 mmol/l) und Durchführung gemäß Abschnitt 4.3. Das Maximum der Absorption liegt bei der Wellenlänge $\lambda = 500$ nm.

2.2 Reaktionsgleichung

Die nach Aufschluß der Cholesterin-haltigen Lipoproteine ablaufenden biochemischen Reaktionen sind der Abbildung 1 zu entnehmen.

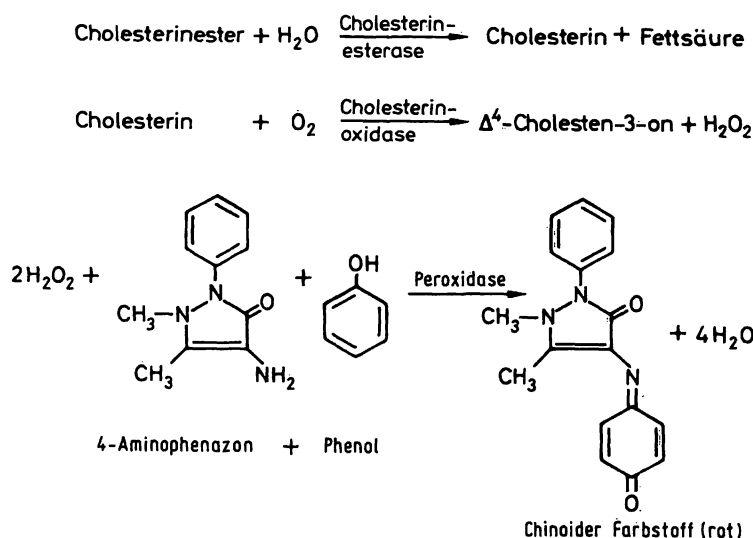


Abb. 1. Reaktionsprinzip der enzymatischen Cholesterinbestimmung mit Bildung eines chinoiden Farbstoffs durch oxidative Kupplung von Phenol und 4-Aminophenazon mit Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Peroxidase.

2.3 Anwendung

Diese „vorläufig ausgewählte Methode“ kann für die Analyse von Serum, Plasma (EDTA, Heparin), Liquor und anderen Körperflüssigkeiten verwendet werden. Nach Abtrennung in der Ultrazentrifuge können auch Lipoproteinfraktionen auf ihren Cholesterin-Gehalt untersucht werden. Hierbei ist die unterschiedliche Reaktivität im ersten Teilschritt gemäß 2.1.1 und damit eine unterschiedliche Kinetik der Gesamtreaktion zu beachten. Bei den sog. „Präzipitationsmethoden“ zur Bestimmung des HDL-Cholesterins ist ein Einfluß der Fällungsmittel auf die enzymatischen Reaktionen auszuschließen (4).

3. Probennahme und Verwahrung des Untersuchungsmaterials

Blut wird nach 12stündiger Nahrungskarenz durch venöse Punktion am liegenden Patienten oder Probanden entnommen.

In Kapillarblut ist mit systematisch niedrigeren Cholesterin-Konzentrationen zu rechnen (5).

Nach Zentrifugation ist das Untersuchungsmaterial (Serum oder Plasma) im verschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur mehrere Stunden, bei +4 °C etwa 1–2 Tage und bei –15 °C für mindestens 6 Monate haltbar.

4. Beschreibung von Material und Methode

4.1 Reagentien

4.1.1 Kalibriermaterialien

Als Kalibriermaterial kann „Cholesterin für biochemische Zwecke“ E. Merck, Art.-Nr. 24622, oder das Präparat SRM 911 des NBS² mit einer Reinheit von 99,8% verwendet werden.

4.1.2 Andere Reagenzien

Natriumchlorid (Art.-Nr. 6404), Kaliumdihydrogenphosphat (Art.-Nr. 4873), di-Kaliumhydrogenphosphat wasserfrei (Art.-Nr. 5101), Phenol (Art.-Nr. 206), Methanol (Art.-Nr. 6009) und Isopropanol (Art.-Nr. 9634) stehen als Handelspräparate (p.a.) der Fa. E. Merck (Darmstadt) zur Verfügung.

4-Aminophenazon (= 4-Aminoantipyrin = 1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-aminopyrazolon) ist unter Art.-Nr. 12373 bei der Fa. Serva (Heidelberg) erhältlich.

Das Detergens Dodecyl-dekaethylenoxid („Thesit“) ist ein Handelspräparat der Fa. Klinke (Hamburg). Auf eine eventuelle Verunreinigung durch Peroxide ist zu achten!

4.1.3 Enzyme

Es werden folgende Enzyme der Fa. Boehringer Mannheim verwendet:

4.1.3.1 Cholesterinesterase (EC 3.1.1.13), Art.-Nr. 393916

Präparation aus Mikroorganismen mit einem Proteingehalt von 2 g/l in NaCl-Lösung (3 mol/l). Spezifische Aktivität etwa 26 U/mg bei Verwendung von Cholesterinoleat als Substrat. Die Spaltung eines Anteils von mindestens 0,98 der im Serum unter physiologischen und pathologischen Bedingungen vorkommenden Cholesterinester muß gewährleistet sein.

4.1.3.2 Cholesterinoxidase (EC 1.1.3.6), Art.-Nr. 393924

Präparation aus *Nocardia erythropolis* mit einem Proteingehalt von 1 g/l in NaCl-Lösung (3 mol/l). Spezifische Aktivität etwa 25 U/mg mit Cholesterin als Substrat.

4.1.3.3 Peroxidase (EC 1.11.1.7), Art.-Nr. 127361

Präparation aus Meerrettich, vorliegend als Lyophilisat (100 mg). Spezifische Aktivität etwa 100 U/mg.

4.1.4 Herstellung der Standard-Lösungen

Cholesterin-Standards: Sämtliche Standards werden in eichfähigen Schliffkolben angesetzt.

a) Stammlösung: 10 mmol/l: 0,387 g Cholesterin (p.a. oder NBS²-Standard) in 100 ml Isopropanol unter leichtem Erwärmen lösen.

b) Arbeits-Standards: Von der Stammlösung werden Verdünnungen angesetzt:

Konzentration	1 mmol/l	2 mmol/l	4 mmol/l	8 mmol/l
Stammlösung (ml)	1,0	2,0	4,0	8,0
Isopropanol (ml)	9,0	8,0	6,0	2,0

4.1.5 Herstellung der Lösungen

Lösung I: Kaliumphosphat-Puffer, 400 mmol/l, pH = 7,7

63,53 g Dikaliumhydrogenphosphat und 4,79 g Kaliumdihydrogenphosphat im Becherglas mit etwa 900 ml bidest. Wasser lösen, sodann Zugabe von 75 ml Methanol und 2,0 g Thesit, gut mischen und mit bidest. Wasser im Meßkolben auffüllen ad 1000 ml. Der pH-Wert der Lösung ist zu prüfen und ggf. zu justieren.

Lösung II: Gepuffertes Phenol, 20 mmol/l, 0,940 g Phenol werden in 500 ml Lösung I

unter leichtem Erwärmen gelöst.

Lösung III: Gepuffertes 4-Aminophenazon, 2 mmol/l, 0,203 g 4-Aminophenazon werden in 500 ml Lösung I gelöst.

² National Bureau of Standards, Office of Standard Reference Materials, Room B 311 / Chemistry Building, Washington, D.C. 20234 (USA).

Lösung IV: Peroxidase, 25 kU/l

1,0 mg Lyophilisat (= 100 U) wird in
4,0 ml NaCl-Lösung (3 mol/l) gelöst.

Lösung V: Enzymgemisch mit folgenden katalytischen Konzentrationen:

Cholesterin-Esterase 26 kU/l,
Cholesterin-Oxidase 7,5 kU/l,
Peroxidase 5 kU/l.

In ein Glasfläschen werden pipettiert

– Cholesterin-Esterase (s. 4.1.3.1)	1,0 ml
– Cholesterin-Oxidase (s. 4.1.3.2)	0,6 ml
– Peroxidase (Lösung IV)	0,4 ml
	2,0 ml

Die Lösungen II und III sind bei +4 °C über mehrere Monate, die Lösung V mehrere Wochen haltbar.

4.1.6 Herstellung eines Reaktionsgemischs

Bei Serienbestimmungen des Cholesterins empfiehlt es sich, für jeweils 10 Analysen folgendes Reaktionsgemisch herzustellen:

- Lösung II 10 ml
- Lösung III 10 ml
- Lösung V 0,2 ml

Die Eigenabsorption des fertigen Reaktionsgemisches sollte bei Messung gegen Luft ($\lambda = 546$ nm) nicht mehr als 0,1 betragen. Das Reaktionsgemisch ist in verschlossener, brauner Flasche bei +4 °C mindestens 1 Woche haltbar.

4.2 Ausrüstung

Verwendung eines Spektralphotometers ($\lambda = 500$ nm) oder eines Spektrallinienphotometers ($\lambda = 546$ nm). Glas- oder Kolbenhubpipetten, Wasserbad von 25 °C; Präzisionsküvetten aus optischem Spezialglas, d = 1 cm entsprechend DIN-Nr. 58963 oder auch Halbmikro-Absaugküvetten.

4.3 Durchführung

In Reagensgläser oder Kunststoffröhrchen werden pipettiert:

	Bestimmungs-Ansatz		
	Reagentien-Leerwert	Cholesterin-Standard(s)	Probenmaterial
Standard/Probe (ml)	–	0,02	0,02
Reaktionsgemisch (ml)	2,00	2,00	2,00

Die Gefäße werden verschlossen, der Inhalt gründlich gemischt und im Wasserbad bei 25 °C inkubiert. Bei den gemäß Abschnitt 4.1.5 verwendeten Endkonzentrationen von Reagentien und Enzymen erreicht die Absorption bereits nach 10 min ein Plateau (s. Abb. 3). Der gebildete Farbstoff ist demnach zwischen 15 und 45 min nach Reaktionsbeginn stabil. Aus Sicherheitsgründen ist eine *Ableseung der Absorption nach 30 min* zu empfehlen.

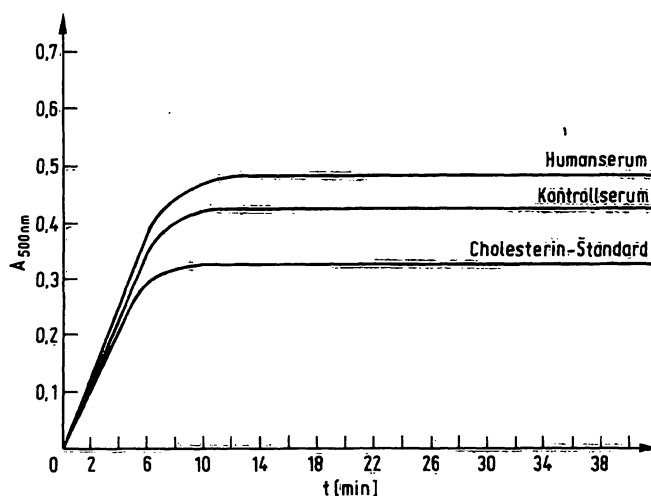


Abb. 3. Kinetik der Reaktion für einen primären Cholesterin-Standard (5,0 mmol/l, NBS) und 2 Cholesterinester-haltige Serumproben bei der Wellenlänge $\lambda = 500$ nm. Die vorgeschlagene Meßzeit von 30 min beträgt das 3-fache der für das Erreichen des Plateaus nötigen Reaktionszeit.

4.4 Berechnung

4.4.1 Bei Mitführen eines Cholesterinstandards von z.B. 4,0 mmol/l ergibt sich:

$$\frac{\text{Absorption}_{\text{Probe}}}{\text{Absorption}_{\text{Standard}}} \times 4,0 = \text{Cholesterin (mmol/l)}$$

4.4.2 Bei konstanten Reaktions- und Meßbedingungen ist die Berechnung über einen konstanten Faktor vorzuziehen:

Meßwellenlänge 500 nm:

$$A_{\text{Probe}} \times 15,1 = \text{Cholesterin (mmol/l)}$$

Meßwellenlänge 546 nm:

$$A_{\text{Probe}} \times 22,1 = \text{Cholesterin (mmol/l)}$$

Diese Faktoren ergeben sich bei Einsatz geeigneter Cholesterin-Standards und Messung im monochromatischen Licht (s. Tab. 1).

4.5 Testbedingungen und Endkonzentrationen im Ansatz

Kenngröße/Konzentration	Manuelles Verfahren	Einheit
Temperatur	25 ± 1	°C
pH	7,7 ± 0,1	
Reaktionszeit	30	min
Probenverdünnung	1:101	—
Meßwellenlänge	500 oder 546	nm
Kaliumphosphat-Puffer	394	mmol/l
Phenol	9,9	mmol/l
4-Aminoantipyrin	0,99	mmol/l
Methanol	1830	mmol/l
Dodecyl-dekaethylenoxid (Thesit)	2,0	g/l
Cholesterinesterase	260	U/l
Cholesterinoxidase	76	U/l
Peroxidase	50	U/l
Maximal zulässige Konzentration von Cholesterin im Ansatz	0,125	mmol/l

5. Zuverlässigkeit der Methode

5.1 Unpräzision

Unter exakter Einhaltung der in Abschnitt 4 festgelegten Arbeitsvorschrift wurde in 3 Laboratorien von Mitgliedern der Arbeitsgruppe ein langfristiger Ringversuch durchgeführt. Folgendes Untersuchungsmaterial wurde analysiert:

5.1.1 Cholesterin-Standard 5,0 mmol/l (NBS)²⁾

5.1.2 Cholesterin-Standard 5,17 mmol/l (Precimat Boehringer)

5.1.3 Kontrollserum deklariert 6,94 mmol/l (Precilip Boehringer)

5.1.4 Kontrollserum unbekannter Konzentration (Seronorm Nyegaard)

5.1.5 Human-Poolserum 1 im niedrigen Konzentrations-Bereich

5.1.6 Human-Poolserum 2 im hohen Konzentrations-Bereich

Von diesen Kontrollmaterialien wurden jeweils 15 Doppelbestimmungen an verschiedenen Arbeitstagen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden auf ablohfähigen Belegen protokolliert und mittels geeigneter Verfahren (6) ausgewertet.

Eine Zusammenfassung der Ringversuchs-Ergebnisse zeigt die Tabelle 1: In den 3 teilnehmenden Laboratorien wurden Variationskoeffizienten (VK) zwischen 1,0 und 4,4% ermittelt. Die Unpräzision der Methode liegt im Mittel je nach Kontrollmaterial und Cholesterin-Gehalt zwischen 1,13 und 2,19% VK.

5.2 Richtigkeit

5.2.1 Linearitätsbereich

Die enzymatische Methode liefert für die eingewogenen Cholesterin-Standards (s. Abschnitt 4.1.3)

Tab. 1. Ringversuch zur enzymatischen Cholesterin-Bestimmung mit der „Vorläufig ausgewählten Methode“. Angabe von Mittelwert \bar{x} , Standardabweichung s und Variationskoeffizient VK für die Unpräzision von Tag zu Tag. s^*) bedeutet die absolute Standardabweichung in den 15 Doppelbestimmungen = Unpräzision in der Serie, I = 1. Wert, II = 2. Wert der Doppelbestimmung.

		Angabe der Absorption				Angabe der Konzentration (mmol/l)							
		NBS-Standard (5,0 mmol/l)		Precimat (5,17 mmol/l)		Precilip EL (6,94 mmol/l)		Seronorm		Humanpool 1		Humanpool 2	
		I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Code-Nr. 91	\bar{x}	0,236	0,237	0,241	0,240	6,86	6,86	7,52	7,53	3,16	3,14	7,74	7,75
Labor A	s	0,0024	0,0012	0,0011	0,0002	0,08	0,07	0,05	0,04	0,03	0,02	0,06	0,05
(546 nm)	VK %	1,03	0,50	0,47	0,75	1,15	0,98	0,72	0,47	0,95	0,66	0,74	0,59
	s*)	0,001		0,001		0,031		0,028		0,023		0,030	
Code-Nr. 23	\bar{x}	0,227	0,225	0,236	0,236	6,82	6,76	7,31	7,32	3,03	3,04	7,49	7,46
Labor B	s	0,0025	0,0031	0,0031	0,0031	0,14	0,16	0,15	0,15	0,14	0,14	0,15	0,11
(546 nm)	VK %	1,11	1,37	1,33	1,31	2,06	2,32	2,02	2,06	4,47	4,66	1,99	1,49
	s*)	0,002		0,003		0,068		0,083		0,054		0,091	
Code-Nr. 90	\bar{x}	0,331	0,330	0,339	0,338	6,56	6,59	7,49	7,52	3,10	3,11	7,48	7,48
Labor C	s	0,0027	0,0030	0,0033	0,0026	0,07	0,07	0,05	0,07	0,05	0,03	0,06	0,07
(500 nm)	VK %	0,80	0,91	0,98	0,76	1,055	1,069	0,68	0,91	1,48	1,10	0,74	0,90
	s*)	0,002		0,001		0,063		0,059		0,029		0,061	
Mittelwerte der drei	\bar{x}					6,74		7,45		3,10		7,57	
Laboratorien	s					0,10		0,08		0,07		0,08	
	VK %					1,44		1,13		2,20		1,07	

proportionale Meßsignale, d.h. es besteht Linearität von 1,0–10,0 mmol/l (s. Abb. 4). Darüberhinaus erhöhte Cholesterin-Konzentrationen im Serum werden erfahrungsgemäß nicht exakt erfaßt, so daß in diesen Fällen die Probe mit NaCl-Lösung 0,154 mol/l 1 + 1 verdünnt werden muß. Dabei ist die Beendigung der Reaktion zweckmäßig an einem Photometer mit Schreiber zu kontrollieren.

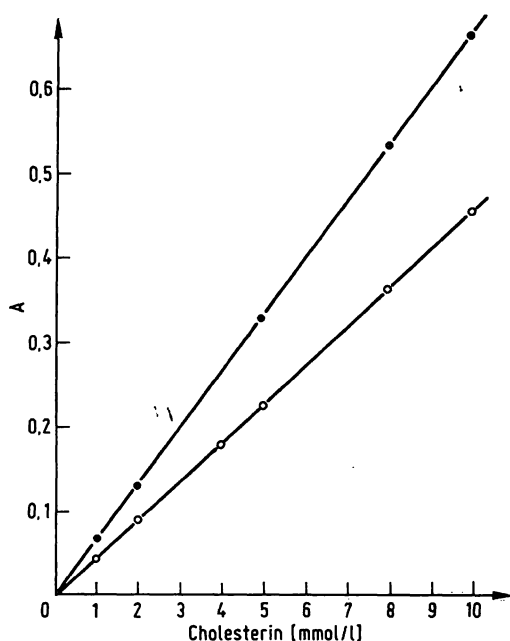


Abb. 4. Linearität der Methode unter Verwendung primärer Cholesterin-Standards von 1,0–10,0 mmol/l. Messung bei zwei Wellenlängen:
 ● — ● = 500 nm.
 ○ — ○ = 546 nm.

5.2.2 Spezifität

Wie die Untersuchungen von *Richmond* (1), *Flegg* (2), sowie *Smith & Brooks* (7) gezeigt haben, ist die Spezifität der Cholesterinoxidase nicht ausschließlich auf Cholesterin gerichtet, sondern es werden auch andere 3- β -Hydroxysterine mit einer Seitenkette von 2 bis 8 Kohlenstoffatomen umgesetzt. Derartige Substanzen kommen im menschlichen Serum jedoch nur in Anteilen von weniger als 0,0002 des Gesamt-Cholesterins vor (21) und führen daher zu keiner signifikanten Erhöhung des enzymatisch bestimmten Cholesterins.

Falsch niedrige Cholesterin-Gehalte resultieren dagegen bei ungenügender Spezifität und Aktivität der Cholesterinesterase: Beim Vergleich sechs kommerzieller Testkits zur enzymatischen Cholesterin-Bestimmung fanden *Tel & Berends* (8) sehr unterschiedliche Spezifitäten der verwendeten Esterasen für verschiedene, physiologisch vorkommende Cholesterinester des Serums, weshalb bei Kontrollseren falsch niedrige Werte resultierten.

5.2.3 Störeinflüsse, Interferenzen

Die Verwendung bestimmter Detergentien (z.B. Tween 20, Triton X-405) im Reagens (s. 4.1) kann nach den Untersuchungen von *Miner-Williams* (9) zur vollständigen Hemmung der Cholesterinoxidase führen. Von verschiedenen Autoren (10, 11, 12) wurden Störeinflüsse in der Probe analysiert: Hämoglobin bis 1000 mg/l und Harnsäure bis 1,2 mmol/l beeinflussen die enzymatische Cholesterin-Bestimmung nicht. Dagegen ist in ikterischen Serumproben mit falsch niedrigen Cholesterin-Konzentrationen zu rechnen (12). Nach eigenen Untersuchungen können jedoch die bei Erwachsenen gefundenen Abweichungen in der Praxis vernachlässigt werden. Bei Neugeborenen wurden dagegen im Einzelfall bis zu 23% niedrigere Cholesterin-Konzentrationen als bei Verwendung der sog. „Katalase-Methode“ beobachtet (13). Bei starker Lipämie des Serums muß ein Probenleerwert gemäß Pipettierschema (s. 4.3) angesetzt werden, bei dem das Enzymgemisch (Lösung V) statt 0,6 ml Cholesterinoxidase das entsprechende Volumen NaCl-Lösung (3 mol/l) enthält.

Eine mögliche Störung durch Arzneimittel wurde für die sog. „Katalase-Methode“ von *Staehler et al.* (15) untersucht, wobei sich für 53 verschiedene Substanzen keine Störung nachweisen ließ. Bei Übertragung dieser Ergebnisse auf das hier beschriebene Verfahren muß die geringere Spezifität der Peroxidase-Methode beachtet werden. Dies führt nach den Untersuchungen von *Haeckel et al.* (16) jedoch nicht zu einer höheren Arzneimittelinterferenz. Von *Borner & Klose* (17) wurde allerdings gezeigt, daß Ascorbinsäure ab einer Konzentration von 100 mg/l eine deutliche Abnahme des Meßsignals bewirkt.

5.2.4 Methodenvergleich

Ein erster Methodenvergleich zwischen einer enzymatischen Cholesterinbestimmung und dem als Referenzmethode angesehenen Verfahren von *Abell et al.* (18) wurde von *Roeschlaue et al.* (14) durchgeführt. Dabei ergab sich bei 34 Humansenen eine sehr gute Übereinstimmung der Meßwerte mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,99. Eine Übertragung dieser mit der sog. „Katalase-Methode“ gewonnenen Ergebnisse auf die hier beschriebene Methode schien nach den Untersuchungen von *van Gent* (19) gerechtfertigt zu sein. In der Folge fiel jedoch auf, daß bei Verwendung der Methode systematisch niedrigere Cholesterin-Konzentrationen gemessen wurden als mit einer Referenzmethode. Auch bei dem von uns durchgeführten Ringversuch wurde ein derartiges Ergebnis erhalten (s. Tab. 2):

Tab. 2. Methodenvergleich zwischen der „Vorläufig ausgewählten Methode“ (III), einer gaschromatographischen Referenzmethode (II) und einer definitiven Methode mittels Isotopenverdünnung-Massenspektrometrie (I).
Angabe der Cholesterin-Konzentration (Mittelwert \pm Standardabweichung) in den Proben des Ringversuchs (s. Abschnitt 5.1).
Alle Angaben in mmol/l.
Die Absorptionswerte der beiden primären Standards von Tab. 1 wurden mittels konstanter Faktoren in Konzentrationen umgerechnet.
Mit der „Ausgewählten Methode“ werden die Cholesterin-Standards weitgehend richtig bestimmt, während bei den 4 biologischen Materialien um 3,6 bis 8,0% zu niedrige Werte resultieren.

Methode (n = Anzahl der Messungen)	NBS-Standard (5,00 mmol/l)	Precimat (5,17 mmol/l)	Precilip EL (6,94 mmol/l)	Seronorm —	Humanpool 1	Humanpool 2
I ID/MS (n = 10)	5,03 \pm 0,05	5,29 \pm 0,04	7,27 \pm 0,11	7,83 \pm 0,15	3,21 \pm 0,04	8,20 \pm 0,17
II GLC (n = 12)	4,82 \pm 0,08	5,13 \pm 0,12	7,23 \pm 0,09	7,91 \pm 0,12	3,20 \pm 0,06	8,23 \pm 0,12
III CHOD/PAP (n = 90)	5,07 \pm 0,12*)	5,21 \pm 0,09*)	6,74 \pm 0,10	7,45 \pm 0,08	3,10 \pm 0,07	7,57 \pm 0,08
Abweichung III—I						
absolut (mmol/l)	+0,05	−0,08	−0,53	−0,39	−0,12	−0,64
relativ (%)	+0,91	−1,49	−7,24	−4,93	−3,64	−7,85
Abweichung III—II						
absolut (mmol/l)	+0,25	+0,08	−0,49	−0,46	−0,10	−0,66
relativ (%)	+5,14	+1,64	−6,77	−5,87	−3,10	−8,00

Die enzymatisch gemessenen Cholesterin-Konzentrationen lagen um 3,6 bis 8,0% niedriger als die Werte der Definitiven Methode nach *Siekmann* et al. (20) bzw. der Referenzmethode nach *Gambert* et al. (21). Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, ist die Abweichung minimal bei den beiden Cholesterinstandards NBS und Precimat. Dies weist daraufhin, daß die mit biologischem Material gefundene systematische Abweichung auf einer inkompletten Esterspaltung beruhen könnte. Diese Annahme wurde inzwischen mittels quantitativer Dünnschichtchromatographie von *Siedel* et al. (22) bestätigt. Die gleichen Autoren wiesen nach, daß man mit einer aus einem *Pseudomonas*-Stamm isolierten Cholesterinesterase und durch Wahl geeigneter Detergentien eine vollständige Esterspaltung erzielen kann. Mit der diesem Prinzip entsprechenden Methode (sog. „Monotest-Cholesterin neu“³⁾) haben wir eine Nachuntersuchung der Ringversuchsproben durchgeführt. Als Abweichung gegenüber den Werten der Definitiven Methode ergab sich für

— Precilip EL	−1,14%
— Seronorm	−2,00%
— Humanpool 1	+0,86%
— Humanpool 2	+2,21%

³⁾ Den Herren Dr. Gruber, Priv. Doz. Dr. Stähler und Dr. Jaworek vom Biochemica Werk Tutzing der Fa. Boehringer Mannheim sei für die Überlassung von Versuchsmustern gedankt.

Daraus ist zu schließen, daß mit der verbesserten enzymatischen Methode weitgehend richtige Werte erhalten werden.

6. Praktikabilität

Mit der enzymatischen Methode kann ein geübter Untersucher eine Cholesterinbestimmung im Serum in etwa 45 min durchführen. Bei Vorbereitung eines Reaktionsgemischs und Verwendung einer Absaugküvette lassen sich auch 10–20 Bestimmungen in der gleichen Zeit bewältigen. Die Anwendung der Methode auf teil- oder vollmechanisierte Analysensysteme ist beschrieben (3, 16, 17, 19). Die Reagentienkosten betragen bei manueller Durchführung in der hier beschriebenen Form etwa 1,40 DM pro Analyse (Stand 1980). Sie liegen bei Vollmechanisierung je nach System höher oder niedriger.

7. Einflußgrößen

Wie bereits im Abschnitt 3 beschrieben, sollte die Probennahme am liegenden Patienten erfolgen, da bei längerer Orthostase falsch hohe Cholesterin-Konzentrationen resultieren. Obwohl akute Nahrungseinflüsse vernachlässigbar gering sind, ist bei Erwachsenen eine 12stündige Nahrungskarenz vor der Blutentnahme zu empfehlen. Es besteht anscheinend keine Tagesrhythmik, dagegen eine deutliche Altersabhängigkeit, d.h. das Cholesterin im Serum steigt im höheren Lebensalter an.

8. Referenzbereiche

Neben einer standardisierten Probennahme ist die Zuverlässigkeit der verwendeten Methode wichtigste Vorbedingung für die Ermittlung gültiger Referenzbereiche. Aufgrund der oben erwähnten Daten zur Unpräzision und Richtigkeit (s. Abschnitt 5.1 und 5.2) erfüllt die Methode der enzymatischen Cholesterin-Bestimmung diese Anforderungen in vollem Umfang. Allerdings liegt bei der Festlegung von Referenzbereichen für Lipide im Serum ein besonderes Problem darin, daß diese Kenngrößen in wechselndem Ausmaß von Lebensalter, Geschlecht und Rasse abhängen, ganz abgesehen von Einflüssen der Ernährung.

Mit der Methode der enzymatischen Cholesterin-Bestimmung (sog. „Katalase-Methode“) fanden Kattermann et al. (23) im Vergleich zu früheren Angaben deutlich niedrigere Referenzbereiche:

Referenz-Stichprobe (n)	-2 s	Median	+2 s	Einheit
Männer (289)	3,29	4,77	6,89	mmol/l
Frauen (96)	3,44	5,00	6,53	mmol/l

Die Meßergebnisse dieser Stichprobe waren lognormal verteilt, weshalb die Unter- bzw. Obergrenze des Referenzbereichs über die Logarithmen der Standardabweichung berechnet wurden (23).

Mit der hier beschriebenen „Ausgewählten Methode“ wurden neuerdings von Borner & Wegscheider (24) größere Stichproben von Erwachsenen zwischen 16 und 62 Jahren untersucht:

Referenz-Stichprobe (n)	Perzentil 2,5	Median	Perzentil 97,5	Einheit
Männer (934)	3,29	5,16	7,80	mmol/l
Frauen (1316)	3,36	5,04	7,90	mmol/l

Beim Vergleich mit den Ergebnissen von Kattermann et al. (23) fällt eine höhere Obergrenze des Referenzbereichs bei praktisch gleicher Lage von Median und Untergrenze ins Auge. Für diesen Unterschied könnten regionale Unterschiede (Göttingen/Berlin) oder ein unterschiedlich hoher Anteil von Probanden im höheren Lebensalter verantwortlich sein.

Die Frage nach der klinischen Relevanz abgestufter Referenzbereiche hinsichtlich eines Atherosklerose-Risikos („Idealbereich“ bzw. „Verdachtsbereich“) wird gegenwärtig noch widersprüchlich diskutiert. Es besteht aber Übereinstimmung darin, daß bei Konzentrationen des Gesamt-Cholesterins im Serum zwischen 5,0 und 7,0 mmol/l eine Messung des in den Lipoproteinfractionen transportierten Cholesterins (LDL/HDL- oder α -Lipoprotein-/ β -Lipoprotein-Cholesterin) erfolgen sollte.

9. Literatur

- Richmond, W. (1973) Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin. Chem.* 19, 1350–1356.
- Flegg, H. M. (1973) An investigation of the determination of serum cholesterol by an enzymatic method. *Ann. Clin. Biochem.* 10, 79–83.
- Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S., Richmond, W. & Fu, P. C. (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20, 470–475.
- Steele, B. W., Koehler, D. F., Azar, M. M. & Dempsey, M. (1976) Enzymatic determinations of cholesterol in high-density-lipoprotein fractions prepared by a precipitation technique. *Clin. Chem.* 22, 98–101.
- Kupke, I. R., Zeugner, S., Gottschalk, A. & Kather, B. (1979) Differences in lipid and lipoprotein concentrations of capillary and venous blood samples. *Clin. Chim. Acta* 97, 279–283.
- Hansert, E. & Stamm, D. (1980) Determination of assigned values in control specimens for internal accuracy control and for interlaboratory surveys. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 18, 461–490.
- Smith, A. G. & Brooks, C. J. W. (1974) Application of cholesterol oxidase in the analysis of steroids. *J. Chromatogr.* 101, 373–378.
- Tel, R. M. & Berends, G. T. (1980) Incomplete hydrolysis of cholesteryl esters during the enzymatic cholesterol determination as evidenced by aqueous cholesteryl ester solutions: Comparison of six enzymatic procedures with the Liebermann-Burchard-Method. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 18, 595–601.
- Miner-Williams, W. (1980) Surfactant inhibition of cholesterol oxidase. *Clin. Chim. Acta* 101, 77–84.
- Pesce, M. A. & Bodourian, S. H. (1977) Interference with the enzymic measurement of cholesterol in serum by use of five reagent kits. *Clin. Chem.* 23, 757–760.
- Deacon, A. C. & Dawson, P. G. (1979) Enzymic assay of total cholesterol involving chemical or enzymic hydrolysis – a comparison of methods. *Clin. Chem.* 25, 976–984.
- Witte, D. L., Brown, L. F. & Feld, R. D. (1978) Effects of bilirubin on detection of hydrogen peroxide by use of peroxidase. *Clin. Chem.* 24, 1778–1782.
- Kupke, I. R. Unveröff. Ergebnisse.
- Röschlau, P., Bernt, E. & Gruber, W. (1974) Enzymatische Bestimmung des Gesamt-Cholesterins im Serum. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 12, 403–407.
- Staehler, F., Munz, E. & Kattermann, R. (1975) Enzymatische Bestimmung von Gesamtcholesterin im Serum. *Dt. Med. Wochenschr.* 100, 876–887.

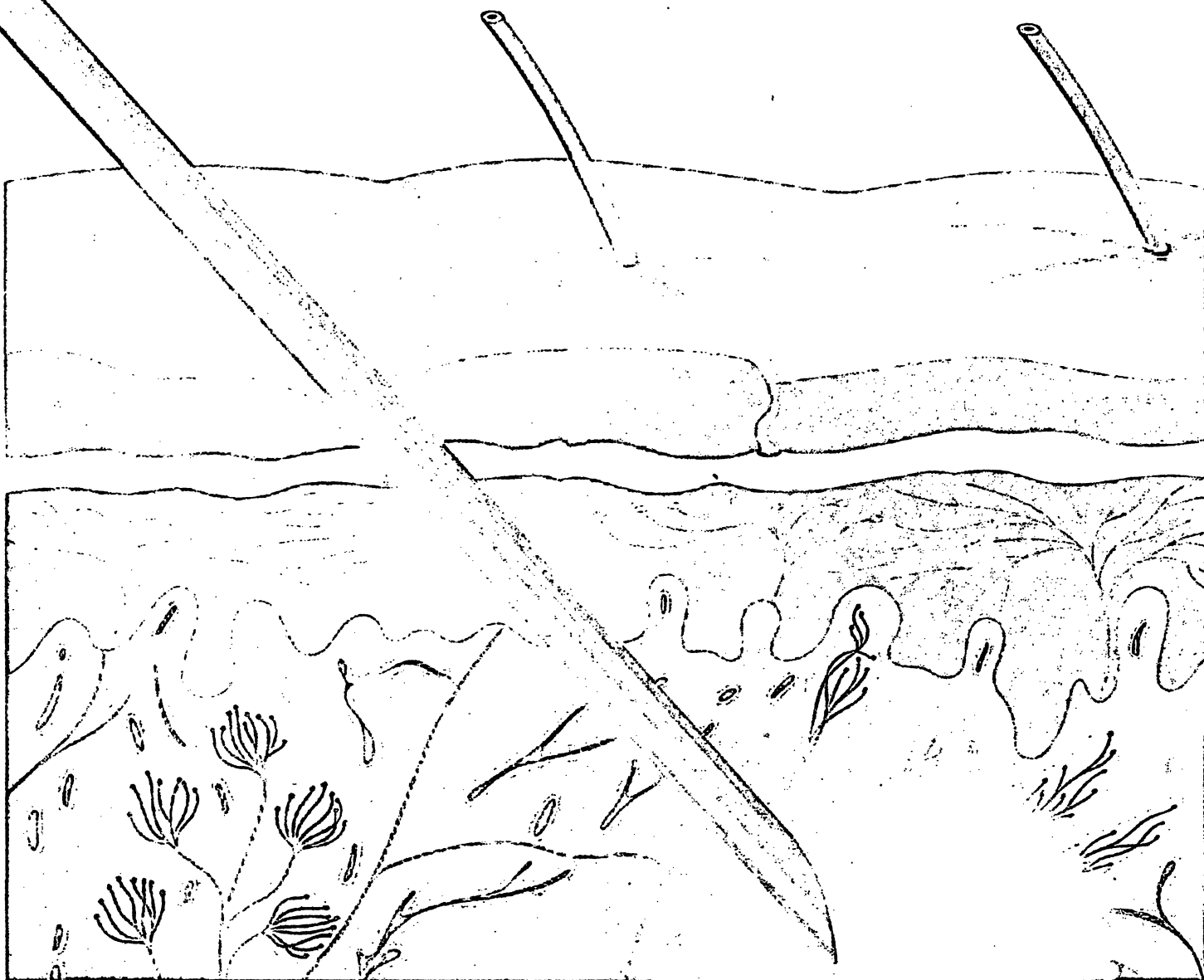
16. Haeckel, R., Sonntag, O., Külpmann, W. R. & Feldmann, U. (1979) Comparison of 9 methods for the determination of cholesterol. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 17, 553–563.
17. Borner, K. & Klose, S. (1977) Enzymatische Bestimmung des Gesamtcholesterins mit dem Greiner Selective Analyzer (GSA-II). *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 15, 121–130.
18. Abell, L. L., Levy, B. B., Brodie, B. & Kendall, F. E. (1952) A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J. Biol. Chem.* 195, 357–366.
19. van Gent, C. M., van der Voort, H. A., de Bruyn, A. M. & Klein, F. (1977) Cholesterol determinations: A comparative study of methods with special reference to enzymatic procedures. *Clin. Chim. Acta* 75, 243–251.
20. Siekmann, L., Hüskes, K. P. & Breuer, H. (1976) Determination of cholesterol in serum using mass fragmentography: A reference method in clinical chemistry. *Z. Anal. Chemie* 279, 45–46.
21. Gambert, P., Lallemand, A., Archambault, A., Maume, B. F. & Padieu, P. (1979) Assessment of serum cholesterol by two methods: Gas-liquid chromatography on a capillary column and chemical ionization-mass fragmentography with isotopic dilution of (3,4-¹³C)cholesterol as internal standard. *J. Chromatogr.* 162, 1–6.
22. Siedel, I., Schlumberger, H., Klose, S., Ziegenhorn, I. & Wahlefeld, A. W. (1981) Improved reagent for the enzymatic determination of serum cholesterol. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19, 838.
23. Kattermann, R., Köhring, B. & Bunne, B. (1976) Normbereiche von Cholesterin und Triglyceriden im Serum: Vergleich enzymatischer und kolorimetrischer Methoden. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 101, 953–957.
24. Borner, K. & Wegscheider, H. (Unveröff. Ergebnisse).

Prof. Dr. R. Kattermann
Klinisch-Chemisches Institut
Klinikum Mannheim der Universität Heidelberg
Theodor-Kutzer-Ufer 8
D-6800 Mannheim

Neu

»Heparin low dose« Test

Erstmals Kontrolle der „Thromboseprophylaxe“ mit niedrig dosiertem Heparin möglich



Subkutan appliziertes Heparin wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. Von Patient zu Patient treten bei einer schematischen Dosierung unterschiedliche Wirkspiegel auf. In vielen Fällen wird deshalb kein ausreichender Schutz erreicht (non-responder).

Die Kontrolle des Heparinspiegels bei der low dose Prophylaxe schafft die Voraussetzung für eine individuelle Dosierung. Damit wird für den einzelnen Patienten ein

verbesserter Thromboseschutz erreicht.

Der »Heparin low dose« Test erfaßt die antithrombotische Wirkung des subkutan applizierten Heparins in einem Konzentrationsbereich von 0,01–0,2 USP-Einheiten/ml Plasma. In diesem Bereich liegt der Heparinspiegel unter der low dose Prophylaxe. Mit den bisher üblichen konventionellen Testmethoden können diese niedrigen Konzentrationen nicht erfaßt werden.

Coupon

Bitte senden Sie mir ausführliche Informationen über »Heparin low dose« Test

Name _____

Straße _____

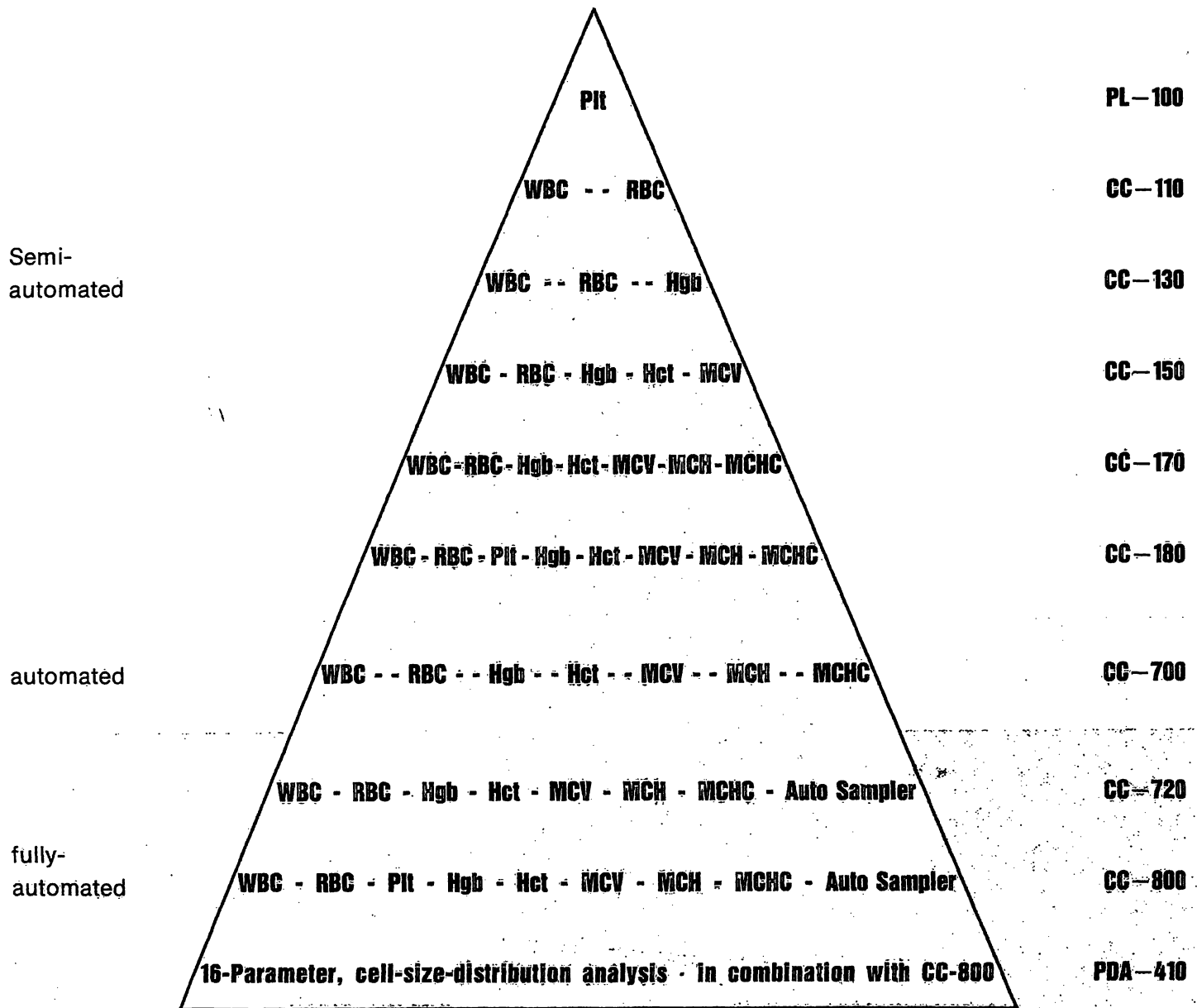
PLZ/Ort _____



Boehringer Mannheim GmbH
Abt. M-D II
Postfach 31 01 20
6800 Mannheim 31

Systemex™

Instrumentation for Hematology



TOA MEDICAL ELECTRONICS CO., LTD., dedicated to producing the finest in medical laboratory instrumentation systems, offers the Systemex™ line of top quality products.

Accuracy, precision, and reliability are assured through continued research, advanced engineering, and reliable quality assurance programs.

Extensive testing and evaluation have resulted in functionally designed instrument systems that are easy to operate and maintain – and the program continues, guaranteeing instrumentation as advanced as the company itself.

Contact your local Systemex™ customer service representative or our offices for additional information on our system components.

TOA MEDICAL ELECTRONICS CO., LTD.

P.O. Box 1002 Kobe Central Post Office, Japan

TELEPHONE: 07 94-24 11 71

CABLE: TOAMELEC KAKOGAWA

TOA MEDICAL ELECTRONICS DEUTSCHLAND GmbH

Tarpen 15 A D-2000 Hamburg 62, Germany

TELEPHONE: 040-5 27 83 72/040-5 27 83 79

CABLE: TOAMELEC HAMBURG

TOA MEDICAL ELECTRONICS (U.S.A.) INC.

1515E. Del Amo Blvd., Carson, California 90746, U.S.A.

TELEPHONE: 213-638-0324

TELEX: 182 456 TOA ME ORSN